

# たん白質の種類の違いが運動後の筋力回復に及ぼす影響 —大豆たん白質と乳たん白質の比較—

神崎 圭太\*・原 加奈子・山崎 幸

川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科

## Effects of Dietary Soy and Whey Proteins on Muscle Strength Recovery Following Eccentric Contractions

Keita KANZAKI\*, Kanako HARA and Yuki YAMASAKI

Faculty of Health Science and Technology, Department of Clinical Nutrition, Kawasaki University of Medical Welfare, Okayama 701-0193

### ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of soy or whey protein ingestion on force deficit, protein degradation, and synthesis in rat fast-twitch muscles subjected to eccentric contractions (ECC). Male Wistar rats were fed a 20% protein diet containing either soy protein isolate (SPI), whey protein isolate (WPI), soy protein hydrolysate (SPH), or whey protein hydrolysate (WPH) for 4 weeks. Then, their left anterior crural muscles were exposed to 200-repeated ECC and excised 3 days later. In the WPI and SPH groups, force production in the extensor digitorum longus muscles was recovered, although the force was still reduced in the SPI and WPH groups. In the WPH group, ECC-induced dihydropyridine receptor proteolysis and decreased 4E-BP-1 phosphorylation was also observed. These results suggest that both soy and whey proteins were effective in promoting the recovery of muscle function after ECC treatment. However, in each protein group, the form of protein (i.e. protein or peptide) may be an important factor contributing to this effect. *Soy Protein Research, Japan* **22**, 98-102, 2019.

Key words : soy protein, whey protein, soy peptide, whey peptide, skeletal muscle

筋が引き伸ばされながら力を発揮する収縮様式は、伸張性収縮と呼ばれる。他の収縮様式（短縮性収縮や等尺性収縮）とは異なり、伸張性収縮には、収縮終了後、数日間にわたって筋力低下が継続するという特徴

がある<sup>1)</sup>。身体活動の多くには、この様式の収縮が含まれており、伸張性収縮が主動筋に負荷されることが、激しい運動後にパフォーマンスの低下が長期間継続する要因のひとつであると考えられている。また、筋力低下の継続には、筋力発揮に関わるたん白質の分解が寄与すること<sup>2)</sup>。筋力の早期回復には、筋たん白質合

\*〒701-0193 岡山県倉敷市松島288

成が重要であることも示されている<sup>3)</sup>。

これまでの本助成研究において我々は、分離大豆たん白質 (soy protein isolate: SPI) やSPIに多く含まれるアルギニンをラットに摂取させると、伸張性収縮後のカルパイン活性化や筋たん白質分解が抑制され、筋力が早期に回復することを報告してきた<sup>4,5)</sup>。これに対して、他の先行研究では、SPIの加水分解物である soy protein hydrolysate (SPH), 筋たん白質合成の促進作用があるロイシンを多く含むwhey protein isolate (WPI), およびその加水分解物であるwhey protein hydrolysate (WPH) の摂取の影響が検討されている<sup>6,7)</sup>。しかしながら、これらの先行研究は、1種類のたん白源の効果のみを検討したものであり、大豆たん白質とホエイたん白質、およびこれらの加水分解物であるペプチドが、筋力回復に及ぼす影響を同時に比較・検討した報告はこれまでにない。

そこで本研究では、SPI, WPI, SPH, WPHの摂取が、伸張性収縮後の筋力低下、筋たん白質分解、筋たん白質合成に及ぼす影響を比較・検討することを目的とした。

## 方 法

### 被験動物および試験食の投与

3週齢のWistar系雄性ラットを、1週間の予備飼育の後、SPI群、WPI群、SPH群、WPH群に分類し (各n=10)、各たん白質を20%含む試験食 (Table 1) を4週間自由摂取させた。4週間の飼育期間中において、摂餌量および体重増加量に4群間で差異はみられなかった。

Table 1. Composition of experimental diets

	SPI	WPI	SPH	WPH
g/100 g diet				
SPI (Fujipro F)	22.8	-	-	-
WPI895	-	21.3	-	-
SPH (Hi-Nute AM)	-	-	22.4	-
WPH817	-	-	-	23.3
L-cysteine	0.3	0.3	0.3	0.3
$\beta$ -starch	28.95	30.45	29.35	28.45
$\alpha$ -starch	21.2	21.2	21.2	21.2
Sucrose	10	10	10	10
Corn oil	7	7	7	7
Cellulose	5	5	5	5
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25

SPH, soy protein hydrolysate; SPI, soy protein isolate; WPH, whey protein hydrolysate; WPI, whey protein isolate.

### 伸張性収縮の負荷

4週間の摂餌期間終了後、三種混合麻酔下において、ラットを仰臥位に置き、左脚をフットホルダーに足関節が約90°になるように固定した。フットホルダーと連結したモーターによって、約90°/secの速度で足関節を1秒間で伸展させると同時に、表面電極より電気刺激 (40 V, 50 Hz) を与えて、方脚の下腿前部の筋 (長趾伸筋と前脛骨筋) に伸張性収縮を誘起した。その後、1秒で元の位置に戻し、2秒間安静を保った。これを1サイクルとし、200サイクル繰り返した。反対脚は安静脚とした。収縮3日後に、安静脚と収縮脚から長趾伸筋と前脛骨筋を摘出し、筋力測定と生化学的分析を行った。

### 等尺性収縮力の測定

95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>ガスを注入したリンガー液中 (30°C) において、長趾伸筋の片側を張力計に、反対側を固定用アームにセットし、筋の両端に置かれた電極から通電することで収縮を誘起した。なお、等尺性収縮力の測定は、80 Hzの刺激頻度で行った。その後、筋長および筋湿重量を計測し、筋横断面積を求めた後、この値で等尺性収縮力を除し、固有筋力を算出した。

### 筋中アミノ酸濃度の測定

前脛骨筋の遊離アミノ酸濃度は、ニンヒドリン比色法を用いた全自動アミノ酸分析装置 (JLC-500/V2, 日本電子) を使用し、鳥取大学技術部に外注し、測定した。

### ウエスタンブロット

前脛骨筋のホモジネートに含まれるたん白質を、SDS-PAGEで分画した後、セミドライブロッティング装置を用いて、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。その後、0.05% Tween-20を含むPBSに3%スキムミルクを溶解したバッファーを用いて、PVDF膜を室温で1時間ブロッキングした。洗浄したPVDF膜を抗dihydropyridine receptor (DHPR) 抗体 (MA3-920, Thermo Fisher Scientific)、または抗phospho-4E-BP1抗体 (#2855, Cell Signaling) と一晚反応させた後 (4°C)、再度洗浄を行い、二次抗体と室温で1時間反応させた。化学発光試薬で発光させたバンドをLumiCube Plus (リポニクス) を用いて撮影し、Image Jによる解析を行った。撮影を終えたPVDF膜は、クーマシーブリアントブルー染色を行い、各レーンの総たん白質量の定量に用いた。DHPRおよびphospho-4E-BP1の発現量は、総たん白質量で除した値で表した。

## 統計処理

統計量は平均値±標準誤差で表した。収縮脚と安静脚、およびSPI群、WPI群、SPH群、WPH群の比較には二元配置の分散分析を用いた。分散分析において有意性が認められた場合は、Holm-Sidakの検定にしたがって、統計学的有意性を検討した。なお、有意水準は $p<0.05$ とした。

## 結 果

### 筋中アミノ酸濃度

Fig. 1に前脛骨筋の遊離アミノ酸濃度を示した。ロイシン濃度は、SPI群に対して、WPI群の値が142%、WPH群の値が160%であった。分岐鎖アミノ酸濃度においても、これらと同様の関係性がみられた。一方、アルギニン濃度は、WPI群に対して、SPI群の値が156%、SPH群の値が162%であった。必須アミノ酸濃度はWPI群とWPH群で、総アミノ酸濃度はWPI群で高値がみられた。

### 固有筋力

安静脚に対して、収縮脚の固有筋力は、SPI群が86%、WPH群が85%であり、統計学的有意性が認められた (Fig. 2)。一方、WPI群とSPH群では、これらの差異がみられなかった。

### DHPRとphospho-4E-BP1の量

Fig. 3にDHPRの、Fig. 4にphospho-4E-BP1のデータを示した。安静脚に対する収縮脚のDHPRの量は、WPH群では77%であった。また、phospho-4E-BP1の $\gamma$ -formの量は、SPH群に対して、WPH群の値が57%であった。

## 考 察

レジスタンス運動後の筋たん白質合成を促進する効果は、大豆たん白質に比べ、ホエイたん白質が高いとされる<sup>8)</sup>。しかしながら、運動後の筋力回復を促進する効果に、これらのたん白質間で差異があるかどうかは不明であった。また、たん白質よりも小腸での吸収が速いとされるペプチドの摂取で、異なる効果がみられるかどうかも明らかではなかった。本研究では、伸張性収縮3日後において、WPIおよびSPHの摂取では、筋力が回復するが、SPIおよびWPHの摂取では、筋力が完全には回復しないことが観察された (Fig. 3)。こ

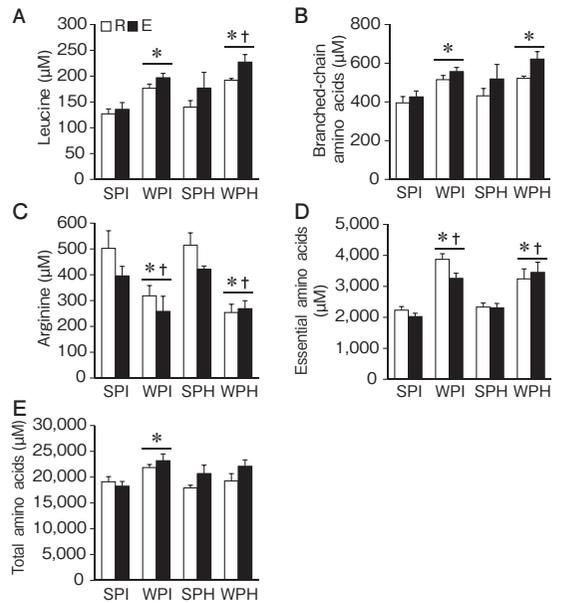


Fig. 1. Amino acid levels in TA muscles of rats fed different experimental diets. Intramuscular levels of leucine (A), branched-chain amino acids (B), arginine (C), essential amino acids (D), and total amino acids (E) were evaluated. Values are means  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). \* $p<0.05$  vs. SPI group, † $p<0.05$  vs. SPH group. E (■), experimental leg; R (□), rested leg; SPH, soy protein hydrolysate; SPI, soy protein isolate; TA, tibialis anterior; WPH, whey protein hydrolysate; WPI, whey protein isolate.

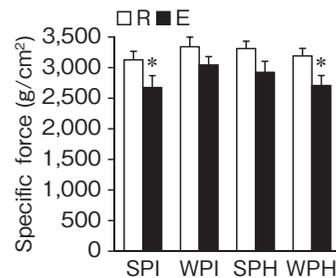


Fig. 2. Specific force in EDL muscles of rats fed different experimental diets. Values are means  $\pm$  SEM ( $n=8-10$ ). \* $p<0.05$  vs. R in each group. E (■), experimental leg; EDL, extensor digitorum longus muscle; R (□), rested leg; SPH, soy protein hydrolysate; SPI, soy protein isolate; WPH, whey protein hydrolysate; WPI, whey protein isolate.

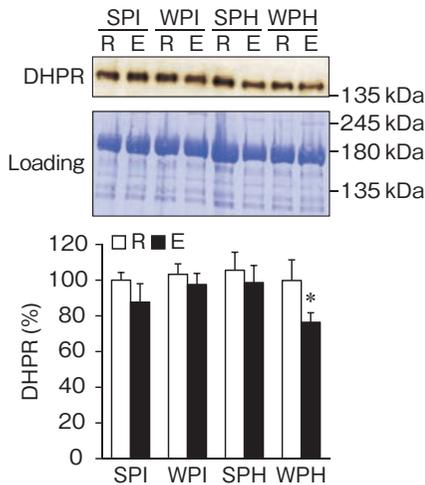


Fig. 3. DHPR levels in TA muscles of rats fed different experimental diets. Values are means  $\pm$  SEM (n=6-8). \* $p$ <0.05 vs. R in each group. E (■), experimental leg; R (□), rested leg; SPH, soy protein hydrolysate; SPI, soy protein isolate; TA, tibialis anterior muscle; WPH, whey protein hydrolysate; WPI, whey protein isolate.

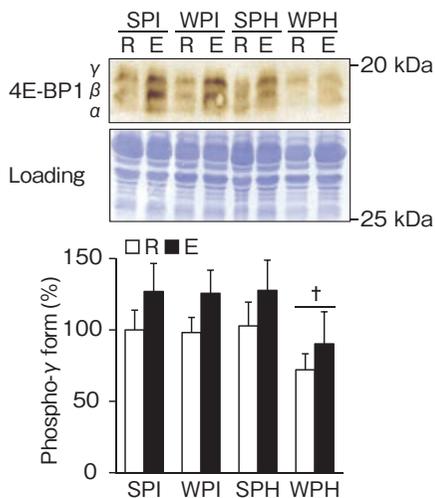


Fig. 4. Phospho-4E-BP1 levels in TA muscles of rats fed different experimental diets. Values are means  $\pm$  SEM (n=6-8). <sup>†</sup> $p$ <0.05 vs. SPH group. E (■), experimental leg; R (□), rested leg; SPH, soy protein hydrolysate; SPI, soy protein isolate; TA, tibialis anterior muscle; WPH, whey protein hydrolysate; WPI, whey protein isolate.

これらの結果は、たん白での摂取とペプチドの摂取で効果は異なるが、たん白源としては、大豆およびホエイのどちらにも、同等の筋力回復促進効果があることを示すものである。

SPIの摂取で筋力回復がみられなかった本研究の結果は、先行研究とは異なるものであった<sup>4)</sup>。SPIに多く含まれるアルギニンから産生される一酸化窒素は、Ca<sup>2+</sup>依存性プロテアーゼであるカルパインのニトロシル化を亢進することにより、伸張性収縮後の筋力発揮に関わるたん白質の分解を軽減し、筋力の回復を促進する<sup>5)</sup>。本研究ではSPIの摂取により、筋中のアルギニン濃度が増加すること (Fig. 1C)、伸張性収縮後にDHPRの分解が起らないこと (Fig. 3) が観察された。SPHの摂取もこれらと同じ結果を示すことから、たん白質の分解以外の要因が、SPHの摂取でみられる筋力回復に寄与していることが推察される。先行研究では、SPIに比べSPHの摂取後には、早期に血中インスリン濃度が上昇すること<sup>9)</sup>、SPHの摂取後には血中成長ホルモン濃度が上昇することが示されている<sup>6)</sup>。これらのホルモンには筋たん白質の合成を促進する作用がある。そこでたん白質合成の間接的な指標である4E-BP1のリン酸化の程度を分析したが、SPI群とSPH群との間に差異は認められなかった (Fig. 4)。一般に、たん白質の摂取が筋収縮後の筋たん白質合成をさらに促進する効果は、収縮1日後までとされるため、今後の研究では、SPIおよびSPHの摂取が、収縮後早期における筋たん白質合成に及ぼす影響を検討すべきである。

大豆たん白質とは異なりホエイたん白質では、筋力の回復がたん白 (WPI) の摂取でみられたが、ペプチド (WPH) の摂取で認められなかった。WPHの摂取では、DHPRの分解と4E-BP1のリン酸化の低下が観察されており、これらが筋力回復がみられない原因と考えられる。しかしながら、WPI摂取とWPH摂取との間で、筋中のロイシン、分岐鎖アミノ酸、必須アミノ酸および総アミノ酸の濃度に差異はみられておらず、また、先行研究では本研究とは異なり、WPIに比べWPHの摂取が、伸張性運動後の筋力回復に効果的であることが示されている<sup>7)</sup>。WPIおよびWPHの摂取が、伸張性収縮後の骨格筋に及ぼす影響についても、さらなる検討が必要である。

## 要 約

本研究では、分離大豆たん白質 (SPI), 分離ホエイたん白質 (WPI), 大豆たん白質加水分解物 (SPH), ホエイたん白質加水分解物 (WPH) の摂取が、伸張性収縮後の筋たん白質の分解・合成および筋力回復に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。Wistar系雄性ラットをSPI群、WPI群、SPH群、WPH群に分類し、各たん白質を20%含む食餌を4週間摂取させた。飼育期間終了後、片脚の下腿前部の筋に、200回の伸張性収縮を負荷した。収縮終了3日後に、長趾伸筋と前脛骨筋を摘出し、以下の結果を得た。1. SPI群とWPH群では、安静脚に対して収縮脚の固有筋力が有意な低値を示した。2. 筋中ロイシン濃度はWPI群とWPH群が高値を、筋中アルギニン濃度はSPI群とSPH群が高値を示した。3. WPH群においては、DHPRの分解とphospho-4E-BP1の減少がみられた。以上のように本研究では、たん白源としては大豆およびホエイのいずれにも、筋力回復を促進する効果があることが示された。しかしながら、その効果は大豆およびホエイごとに、たん白での摂取とペプチドでの摂取で異なった。筋力の回復を目的とする場合は、たん白源の種類によって、どの形状で摂取するかを考える必要があることが示唆された。

## 文 献

- 1) Kanzaki K, Kuratani M, Mishima T, Matsunaga S, Yanaka N, Usui S and Wada M (2010): The effects of eccentric contraction on myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, **110**, 943-952.
- 2) Kanzaki K, Watanabe D, Kuratani M, Yamada T, Matsunaga S and Wada M (2017): Role of calpain in eccentric contraction-induced proteolysis of Ca<sup>2+</sup>-regulatory proteins and force depression in rat fast-twitch skeletal muscle. *J Appl Physiol*, **122**, 396-405.
- 3) Baumann CW, Rogers RG, Otis JS and Ingalls CP (2016): Recovery of strength is dependent on mTORC1 signaling after eccentric muscle injury. *Muscle Nerve*, **54**, 914-924.
- 4) Kanzaki K, Watanabe D, Aibara C, Kawakami Y, Yamada T, Takahashi Y and Wada M (2019): Ingestion of soy protein isolate attenuates eccentric contraction-induced force depression and muscle proteolysis via inhibition of calpain-1 activation in rat fast-twitch skeletal muscle. *Nutrition*, **58**, 23-29.
- 5) Kanzaki K, Watanabe D, Aibara C, Kawakami Y, Yamada T, Takahashi Y and Wada M (2018): L-arginine ingestion inhibits eccentric contraction-induced proteolysis and force deficit via S-nitrosylation of calpain. *Physiol Rep*, **6**, 13582.
- 6) Masuda K, Maebuchi M, Samoto M, Ushijima Y, Uchida Y, Kohno M, Ito R and Hirotsuka M (2007): Effect of soy-peptide intake on exercise-induced muscle damage. *Japanese J Clin Sports Med*, **15**, 228-235.
- 7) Buckley JD, Thomson RL, Coates AM, Howe PR, DeNichilo MO and Roney MK (2010): Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. *J Sci Med Sport*, **13**, 178-181.
- 8) Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA and Phillips SM (2009): Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol*, **107**, 987-992.
- 9) 鍛島秀明, 藤元将樹, 江口航平, 遠藤(山岡)雅子, 三浦 朗, 小林敏夫, 福場良之 (2016): 食事前の大豆たん白質と大豆ペプチドの摂取が食後の血糖調節ならびに胃排出に及ぼす影響. 大豆たん白質研究, **19**, 121-125.